

THESIS

BONN

1969

**WIRKUNG DER  
RINDERMILZ-KATHEPSINE SOWIE  
DES GEREINIGTEN KATHEPSIN B'  
AUF DIE AKTIVITÄT  
EINIGER ENZYME**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt von

**HELMUT HÖRNCHEN**  
aus Hellenthal

Bonn 1969





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153520\\_0154](https://archive.org/details/IA40153520_0154)







**WIRKUNG DER  
RINDERMILZ-KATHEPSINE SOWIE  
DES GEREINIGTEN KATHEPSIN B'  
AUF DIE AKTIVITÄT  
EINIGER ENZYME**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt von

**HELMUT HÖRNCHEN**

aus Hellenthal

Bonn 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. Klaus Otto

Koreferent: Prof. Dr. Friedrich Wilhelm Zilliken

Tag der mündlichen Prüfung: 15.8.69

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität  
B o n n

Direktor: Prof. Dr. Friedrich Wilhelm Zilliken

# INHALTSVERZEICHNIS

## Seite

|                                                |   |
|------------------------------------------------|---|
| I. <u>EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT</u> ..... | 6 |
|------------------------------------------------|---|

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| II. <u>EXPERIMENTELLES</u> ..... | 9 |
|----------------------------------|---|

|                                         |   |
|-----------------------------------------|---|
| 1. Verwendete Kathepsin-Präparate ..... | 9 |
|-----------------------------------------|---|

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 2. Verwendete Enzyme ..... | 10 |
|----------------------------|----|

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| a) Enzyme aus Leberhomogenatüberstand ..... | 10 |
|---------------------------------------------|----|

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| b) Mitochondriale Enzyme ..... | 10 |
|--------------------------------|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| c) Enzyme aus Muskelextrakt ..... | 10 |
|-----------------------------------|----|

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| d) Enzyme aus Gehirnhomogenatüberstand ..... | 11 |
|----------------------------------------------|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| e) Käufliche Enzympräparate ..... | 11 |
|-----------------------------------|----|

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 3. Beschreibung der Teste zur Messung der<br>Enzymaktivität ..... | 12 |
|-------------------------------------------------------------------|----|

|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| 4. Beschreibung der Inaktivierungsansätze ..... | 15 |
|-------------------------------------------------|----|

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| III. <u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u> ..... | 18 |
|---------------------------------------------|----|

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 1. Durch Kathepsin nicht inaktivierte Enzyme ..... | 18 |
|----------------------------------------------------|----|

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| a) Enolase aus Leberhomogenatüberstand ..... | 18 |
|----------------------------------------------|----|

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| b) Glutamat-Dehydrogenase aus Rinderleber und<br>Mitochondrienextrakt ..... | 19 |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| c) Creatinphosphokinase aus Kaninchenmuskel ..... | 21 |
|---------------------------------------------------|----|

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| d) Katalase aus Rinderleber ..... | 21 |
|-----------------------------------|----|

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| e) Tryptophan-Pyrrolase aus Leberhomogenatüber-<br>stand ..... | 22 |
|----------------------------------------------------------------|----|

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| f) Abschließende Betrachtungen ..... | 24 |
|--------------------------------------|----|

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 2. Inaktivierungsversuche mit Pyruvatkinase ..... | 27 |
|---------------------------------------------------|----|

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| a) Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand und<br>Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase ..... | 27 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| b) Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand und<br>Ratten-Muskelextrakt (Normaltiere) ..... | 28 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| c) Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand und<br>Ratten-Muskelextrakt (Hungertiere) ..... | 31 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                | <u>Seite</u> |
|------------------------------------------------|--------------|
| d) Verschiedene Homogenisationsmedien .....    | 33           |
| e) Abschließende Betrachtungen .....           | 33           |
| 3. Inaktivierungsversuche mit Aldolase .....   | 34           |
| a) Kaninchenmuskel-Aldolase .....              | 34           |
| b) Aldolase aus Leberhomogenatüberstand .....  | 39           |
| c) Aldolase aus Gehirnhomogenatüberstand ..... | 43           |
| d) Vergleich der drei Aldolase-Präparate ..... | 43           |
| IV. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u> .....               | 46           |
| V. <u>LITERATUR</u> .....                      | 47           |

ABKÜRZUNGEN UND CHEMIKALIEN

|                         |                                                      |
|-------------------------|------------------------------------------------------|
| <u>ADP</u>              | Adenosin-5'-diphosphat                               |
| <u>ATP</u>              | Adenosin-5'-triphosphat                              |
| <u>CPK</u>              | Creatinphosphokinase                                 |
| <u>EDTA</u>             | Äthylendiamintetraacetat                             |
| <u>FDP</u>              | Fructose-1,6-diphosphat                              |
| <u>FMP</u>              | Fructose-1-monophosphat                              |
| <u>GDH</u>              | $\alpha$ -Glyzerophosphat-Dehydrogenase              |
| <u>GLDH</u>             | Glutamat-Dehydrogenase                               |
| <u>Hydrocortison</u>    | der Firma HOECHST =<br>17-Oxycorticosteron-21-acetat |
| <u>LDH</u>              | Lactat-Dehydrogenase                                 |
| <u>NAD</u>              | oxydiertes<br>Nicotinamid-adenin-dinucleotid         |
| <u>NADH<sub>2</sub></u> | reduziertes                                          |
| <u>PEP</u>              | Phosphoenolpyruvat                                   |
| <u>2-PG</u>             | 2-Phosphoglyzerat                                    |
| <u>PK</u>               | Pyruvatkinase                                        |
| <u>TIM</u>              | Triosephosphat-Isomerase                             |
| <u>Tris</u>             | Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan                     |

Alle käuflichen Enzyme und Biochemikalien waren, soweit nicht anders angegeben, Präparate der Firma BOEHRINGER & Soehne, Mannheim.

## I. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Über den Mechanismus der Biosynthese der Proteine konnten in der letzten Zeit detaillierte Kenntnisse erzielt werden, während sich unser Wissen über die Einzelheiten des Proteinabbaues nur dürftig vermehrt hat. Dies gilt insbesondere für den katheptischen Abbauweg von Enzymproteinen.

RACKER und KRIMSKY (1948, 1949) beobachteten, daß Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase aus Mäusehirn durch ein kathepsinähnliches Material inaktiviert wird, doch wurde diese Richtung anscheinend nicht weiter verfolgt. In der Folgezeit erschienen zwar aus dem Arbeitskreis um FRUTON (1960) wertvolle Beiträge zum Kathepsinproblem, doch blieben Substrate und Funktionen der Kathepsine noch unklar.

OTTO stellte 1966 fest, daß gefriereschädigte Lebern oder Leberhomogenate wie auch ultraschallbehandelte Homogenate von Ratten einen 100 000 x g Überstand lieferten, dessen Glukokinase-Aktivität binnen weniger Stunden fast völlig verschwand. Als Ursache vermutete er die Einwirkung eines mitochondrialen oder lysosomalen Proteins.

In späteren Arbeiten (OTTO und SCHEPERS 1967, OTTO 1967) gelang es nicht nur die Glukokinase-Inaktivierung eindeutig auf ein lysosomales Kathepsin zurückzuführen und präzise Vorstellungen über das die Inaktivierung bewirkende Kathepsin, insbesondere das Kathepsin B', zu entwickeln, sondern auch mehrere cytoplasmatische Enzyme zu finden, die unter Kathepsineinwirkung Aktivitätsverluste aufwiesen. Diese inaktivierten Enzyme waren außer Glukokinase Fructosediphosphat-Aldolase aus Muskel, Fructosediphosphat-Aldolase aus Leber und Pyruvatkinase aus Leber. Der Verlust an Aktivität wurde-zumindest teilweise - als Proteinabbau gedeutet.

Ziel des ersten Teiles dieser Arbeit war es, durch Inaktivierungsteste mehrerer (nicht nur cytoplasmatischer, sondern auch mitochondrialer) Enzyme festzustellen, ob

sich weitere durch Kathepsin inaktivierbare Enzyme auf-  
finden lassen. Für viele Enzyme und Proteine sind aber  
möglicherweise andere Abbaumechanismen, etwa Energie er-  
fordernde, vorherrschend.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß  
die Tyrosin- $\alpha$ -Oxoglutarat-Aminotransferase, für die von  
KENNEY (1962) eine relativ kurze Halbwerts-Lebensdauer von  
nur wenigen Stunden ermittelt wurde und deren Aktivität in  
Leberschnitten bei aerober Inkubation rasch abnimmt, gegen  
den Kathepsin-Angriff stabil ist.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Enzyme Pyruvatkinase  
und Aldolase aus verschiedenen Organen auf den Verlauf der  
kathetischen Inaktivierung genauer untersucht werden.

TANAKA und Mitarbeiter berichteten nämlich über Vorkommen  
(1965) bzw. Kristallisation (1967) zweier verschiedener  
Pyruvatkinasen, eines Enzyms aus Rattenmuskel und eines  
anderen aus Rattenleber. Gleichzeitig erbrachten sie Beweise  
dafür, daß in der Leber neben dem "Lebertyp" des Enzyms  
auch der "Muskeltyp" vorkommt, während aber umgekehrt im  
Muskel kein "Lebertyp" vorkommt. Zur Ermittlung der je-  
weiligen Anteile an Leber- und Muskeltyp der Pyruvatkinase-  
Aktivität eines Leberhomogenatüberstandes inaktivierten sie  
den Muskeltyp durch Anwendung eines Anti-Muskeltyp-Serums,  
während die Lebertyp-Aktivität (etwa 50 - 70% der Gesamt-  
aktivität) hiervon unbeeinflusst blieb.

Die Autoren betonten aber, daß die völlige Identität des  
Muskeltyps der Leber mit dem Muskelenzym noch nicht ge-  
sichert sei.

In Untersuchungen mit einem kathepsinhaltigen Lysosomen-  
extrakt aus Rattenleber stellten OTTO und SCHEPERS (1967)  
fest, daß Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel unter den  
angewendeten Bedingungen praktisch nicht inaktiviert wurde,  
während die Pyruvatkinase-Aktivität eines Leberhomogenat-  
überstandes weitgehend, wenn auch nicht völlig, durch

Kathepsin zerstört wurde. Dieser Befund sprach ebenfalls für zwei verschiedene Pyruvatkinase-Typen und eventuell auch für das Vorkommen des Muskeltyps in der Leber. Es sollte daher die unterschiedliche Inaktivierung der Pyruvatkinasen nochmals, diesmal mit Hilfe eines aktiveren Präparates aus Rindermilz untersucht werden, um vielleicht die Existenz zweier verschiedener Enzymtypen auch auf diese Weise erhärten zu können.

Kaninchenmuskela**ldolase** wird von kathepsinhaltigem Lysosomenextrakt aus Rattenleber bis auf einen geringen Teil (sog. Restaktivität) inaktiviert.

In älteren Aldolasepräparaten beobachtete OTTO (1967, unveröffentlichte Ergebnisse) geringere Aktivität und höhere Restaktivität als in frischen Aldolasepräparaten. Daraus konnte auf eine Art "Alterungsprozess" geschlossen werden, der mit der Zerstörung eines gegenüber Kathepsin nicht stabilen Teiles der Aldolase und einem relativen Anstieg der Aktivität eines gegen Kathepsin inerten Teiles einhergeht. Diese Annahme sollte durch Experimente mit Enzymen aus Leber, Muskel und Gehirn überprüft und näher untersucht werden. Dabei sollten sowohl Fructose-1,6-diphosphat als auch Fructose-1-phosphat Substrate der Aldolase sein.

## II. EXPERIMENTELLES

### 1. Verwendete Kathepsin-Präparate

Die Kathepsin-Präparation wurde von OTTO nach dem von ihm in Anlehnung an GREENBAUM und FRUTON (1957) entwickelten Verfahren (OTTO 1967) vorgenommen. Um den Zusammenhang herzustellen, soll ein kurzer Überblick über die Kathepsingewinnung gegeben werden: Ausgangsmaterial war zerkleinerte Rindermilz. Diese wurde zunächst einer s a u r e n E x t r a k t i o n bei  $P_H$  3,5 unterworfen. Nach anschließender Zentrifugation bei ungefähr  $2000 \times g$  erfolgte im Überstand eine A m m o n i u m s u l f a t - F r a k t i o n i e r u n g, zunächst bei 45% Ammoniumsulfat-Sättigung. Nach erneuter Zentrifugation wie oben wurde das Dekantat einer zweiten Fällung bis 65% Sättigung unterworfen. Die Zentrifugation lieferte einen ockerfarbenen Bodenkörper, der mit ca. 30 - 60 ml Wasser behandelt wurde. Das so erhaltene partiell gereinigte Präparat fand als "65er NS-Kathepsin" - neben weiter gereinigtem Material - Verwendung bei den Inaktivierungsversuchen mit Pyruvatkinase und Creatinphosphokinase.

Für die Inaktivierungsversuche mit den Enzymen Enolase, Glutamat-Dehydrogenase, Katalase und Tryptophan-Pyrrolase wurde eine weitere Reinigung des obigen Kathepsin-Präparates durchgeführt. Nach Dialyse, J o n e n a u s t a u - s c h e r - C h r o m a t o g r a p h i e a n A m b e r - l i t e I R C - 50, Sättigung mit festem Ammoniumsulfat, Abzentrifugieren des Proteinniederschlages, Suspendieren in wenig Wasser und erneuter Dialyse wurde das sogenannte "100er NS-Kathepsin" erhalten.

Die Aldolase-Inaktivierungsversuche wurden mit Kathepsin B' (OTTO 1967) durchgeführt, das durch anschließende G e l c h r o m a t o g r a p h i e a n S e p h a d e x G - 100 o d e r G - 75 von den anderen Kathepsinen abge-

trennt werden konnte.

## 2. Verwendete Enzyme

### a) Enzyme aus Leberhomogenatüberstand

Die Lebern entstammten erwachsenen, meist männlichen Sprague-Dawley- oder Wistar-Ratten.

Vor der Herstellung der Leberhomogenate wurde die Leber zur Entfernung überschüssigen Blutes mit dem Homogenisiermedium "in situ" perfundiert (OTTO 1964). Die Lebern wurden mit dem 3fachen Volumen an Homogenisiermedium (0,15 M KCl oder 0,05 M KCl, 0,001 M EDTA  $p_H$  7,6 oder 0,1 M KCl, 0,05 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, 0,003 M  $MgCl_2$   $p_H$  7,5) im vorgekühlten Glas-homogenisator mit Teflonpistill 30 - 40 Sekunden homogenisiert. Der  $p_H$ -Wert des Homogenates betrug 7,2 - 7,4.

Der 100 000 x g Überstand, erhalten nach 1stündigem Zentrifugieren, diente als Enzymmaterial. Der Proteingehalt der so hergestellten Leberhomogenatüberstände lag bei 20 mg/ml (Bestimmung nach LOWRY [1951] mit Rinderserumalbumin als Standard).

### b) Mitochondriale Enzyme

Ausgangsmaterial waren Rattenlebern gleicher Herkunft und gleicher Vorbehandlung wie unter II, 2, a. Homogenisiermedium war allerdings 0,3 M Saccharose. Nach Entfernung der Kernfraktion bei 1000 x g wurde die Mitochondrienfraktion durch Zentrifugieren bei 10 000 x g isoliert (3maliges Zentrifugieren, 2maliges Resuspendieren in 0,3 M Saccharose). Die Enzymfreisetzung erfolgte durch Einfrieren nach Auflösung des Mitochondrien-Bodenkörpers in wenigen ml 0,01 M  $K^+$ ,  $Na^+$  Phosphatpuffer  $p_H$  7 und anschließendes Wiederauftauen oder durch Zusatz von Triton X-100 (Netzmittel der Firma ROHM & HAAS, Philadelphia) in einer Endkonzentration von 0,05 - 0,1% und anschließendes Zentrifugieren.

### c) Enzyme aus Muskelextrakt

3 - 5 g Muskelgewebe wurden aus dem Gebiet des Musculus

femoralis männlicher Sprague-Dawley- oder Wistar-Ratten entnommen, sorgfältig von Bindegewebsresten befreit und mit 9fachem Volumen Homogenisiermedium (0,05 M KCl, 0,001 M EDTA  $p_H$  7,6 oder 0,15 M KCl) etwa 2 Minuten mit Hilfe des "Ultraturrax" (Hersteller: JANKE & KUNKEL KG, Staufen i.Br.) unter Eiskühlung in Kunststoffröhrchen homogenisiert. Als Enzympräparat diente der nach 1 stündiger Zentrifugation erhaltene 100 000 x g Überstand (mit etwa 5 mg Protein/ml, bestimmt nach LOWRY [1951] ).

#### d) Enzyme aus Gehirnhomogenatüberstand

Die Herstellung erfolgte wie oben für Ratten-Leberhomogenatüberstand beschrieben; allerdings mußte auf die "in situ" Perfusion verzichtet werden. Die Homogenisation erfolgte in 0,15 M KCl (6faches Volumen).

#### e) Käufliche Enzympräparate

Die meisten Inaktivierungsversuche wurden auch mit gereinigten Enzympräparaten der Firma BOEHRINGER & Soehne, Mannheim durchgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten Enzyme und ihre Herkunft gibt Tab. 1.

Tab. 1: Verwendete Enzyme und ihre Herkunft

|                          |                                                   |                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Leberhomogenatüberstand  | Aldolase, Enolase, PK, 1)<br>Tryptophan-Pyrrolase |                                         |
| Mitochondrienextrakt     | GLDH                                              |                                         |
| Muskelhomogenatüberstand | PK                                                |                                         |
| Gehirnhomogenatüberstand | Aldolase                                          |                                         |
| Kaninchenmuskel          | Aldolase, CPK, PK                                 | } isolierte<br>Enzymprot.<br>BOEHRINGER |
| Rinderleber              | GLDH, Katalase                                    |                                         |

1) Genaueres über die Herstellung der Tryptophan-Pyrrolase ist unter "Ergebnisse" aufgeführt.

### 3. Beschreibung der Teste zur Messung der Enzymaktivität

Enzymaktivitäten wurden außer bei Katalase und Tryptophan-Pyrrolase nach dem Prinzip des "optischen Tests" (WARBURG und CHRISTIAN 1936) bestimmt. Dabei wird grundsätzlich die Oxydation von  $\text{NADH}_2$  oder die Reduktion von NAD gemessen:



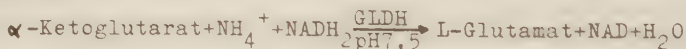
Da  $\text{NADH}_2$  zwischen 300 und 370 nm stark absorbiert, NAD jedoch in diesem Bereich gar nicht (s. Abb. 1), kann durch Messung der Extinktion bei einer geeigneten Wellenlänge (340 oder 366 nm) die Oxydation oder Reduktion dieser Reaktion direkt im Photometer gegen einen Leerwert ohne NAD oder  $\text{NADH}_2$  bestimmt werden. Nicht jede im optischen Test gemessene Enzymreaktion benötigt direkt NAD oder  $\text{NADH}_2$  als Coenzym. Nach RICHTERICH (1965) kann der optische Test folgendermaßen unterteilt werden:

#### 1. einfacher optischer Test

Das zu messende Enzym benötigt selbst  $\text{NADH}_2$ .

Beispiel: Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase nach OLSON und ANFINSEN (1952).

Meßreaktion



#### 2. optischer Test mit Indikatorreaktion

Das zu messende Enzym braucht selbst kein  $\text{NADH}_2$ .

Beispiel: Bestimmung der Pyruvatkinase nach dem Prinzip von NEGELEIN.

Meßreaktion



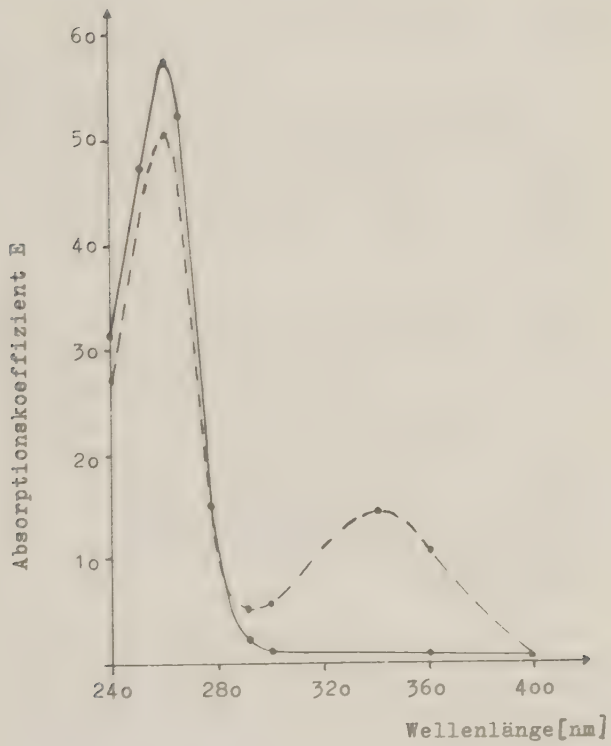


Abb. 1: Absorptionsspektrum von NAD (—) und NADH<sub>2</sub> (---)

### Indikatorreaktion



### 3. optischer Test mit Hilfs- und Indikatorreaktion

Die Meßreaktion wird über ein Hilfsenzym an die Indikatorreaktion gekoppelt.

Beispiel: Bestimmung der Creatinphosphokinase nach TANZER und GILVARY (1959).

### Meßreaktion



### Hilfsreaktion



### Indikatorreaktion



Extinktionsmessungen erfolgten in 10 mm Glas- oder Quarzküvetten im Unicam Spektrophotometer SP 500 oder im Photometer "Eppendorf" der Firma NETHELER & HINZ, Hamburg, mit thermostatisiertem Küvettenhalter und Stufenschalter, der eine Verlagerung des Ablesebereiches in den genügend gestreckten Teil der Skala ermöglichte.

Jeder einzelne optische Test bestand aus mindestens 3 Werten: einem Leerwert (Puffer oder Testlösung ohne NAD bzw.  $\text{NADH}_2$ ), einem Kontrollwert K (Testlösung mit NAD bzw.  $\text{NADH}_2$ ; Enzymlösung ohne Kathepsin) und einem Inaktivierungs-

wert I (Testlösung mit NAD bzw.  $\text{NADH}_2$ ; Enzymlösung mit Kathepsin enthaltend). Die beiden letzten wurden als Hauptwerte bezeichnet.

Die Bestandteile der Testlösung wurden entweder einzeln in die Küvette pipettiert (Volumen 1,5 oder 3 ml) oder im Vielfachen als sogenannte Tageslösung zusammengemischt und als fertige Testlösung in die Küvetten gegeben.

Die Reaktion wurde durch Zusatz von Enzymlösung als Bestandteil der Inkubationslösung (s.u.) gestartet, nachdem nicht interessierende Reaktionen zum Stillstand gekommen waren.

Die Extinktionen der Kontroll- und Inaktivierungswerte wurden minütlich etwa 10 Minuten lang gemessen. Zur Aktivitätsbestimmung diente meist das arithmetische Mittel der minütlichen Extinktionsänderungen ( $= \Delta E$ -Werte) zwischen der 2. und 7. Minute nach dem Start der Reaktion.

Aus den  $\Delta E$ -Werten konnten unter Berücksichtigung der gegebenen Versuchsbedingungen die spezifischen Aktivitäten ermittelt werden. In den meisten Fällen genügte allerdings die Angabe der Aktivität des I-Wertes in % der Aktivität des K-Wertes ( $I = x\% K$ ).

#### 4. Beschreibung der Inaktivierungsansätze

Ziel jedes Inaktivierungsversuches war es zunächst zu klären, ob das getestete Enzym unter Kathepsin-Einfluß seine Enzymaktivität einbüßte oder nicht, ferner in einigen Fällen Aussagen zu machen über den Verlauf der Inaktivierung.

Zu diesem Zweck wurden für jeden Inaktivierungsversuch ein Kontrollansatz und mindestens ein Inaktivierungsansatz (Inkubationsansätze) hergestellt. Die Bestandteile beider Ansätze waren (nach OTTO):

1. 0,5 M Phosphatpuffer  $p_H$  6,2 oder 6,05 als  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  Salz ( $p_H$  Optimum des Kathepsins).
2. Meist 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol (Kathepsinaktivator).

3. Enzymlösung u.U. vorverdünnt.

4. Gegebenenfalls Aqua dest. zur Auffüllung des Volumens.

5. Kathepsin im Inaktivierungsansatz.

Im Kontrollansatz an dieser Stelle Wasser, Puffer oder Albuminlösung (15 mg/ml).

(Die angegebenen Konzentrationen sind nicht Endkonzentrationen).

Bis zum Start des ersten optischen Tests eines Inaktivierungsversuches (des sog. Nullwertes) wurden die Kontroll- und Inaktivierungsansätze in Eiswasser aufbewahrt, um eine vorzeitige Enzyminaktivierung zu verhindern, danach unter gelegentlichem Umschütteln zur Reaktionsbeschleunigung im 30° C, 32° C oder 37° C Wasserbad inkubiert. Im Verlauf der Inkubation wurden Proben aus den Kontroll- und Inaktivierungsansätzen entnommen und zu verschiedenen Zeitpunkten (sog. Zeitwerte) einem optischen Test unterzogen.

Als Inaktivierung wurde ein Absinken der Aktivität des Inaktivierungsansatzes, gemessen als Inaktivierungswert I, von 100% (Nullwert) auf mindestens 40% der Aktivität des Kontrollansatzes, gemessen als Kontrollwert K, nach 2stündiger Inkubation angesehen.

Ein eindeutiges Beispiel ist in Abb. 1 dargestellt.

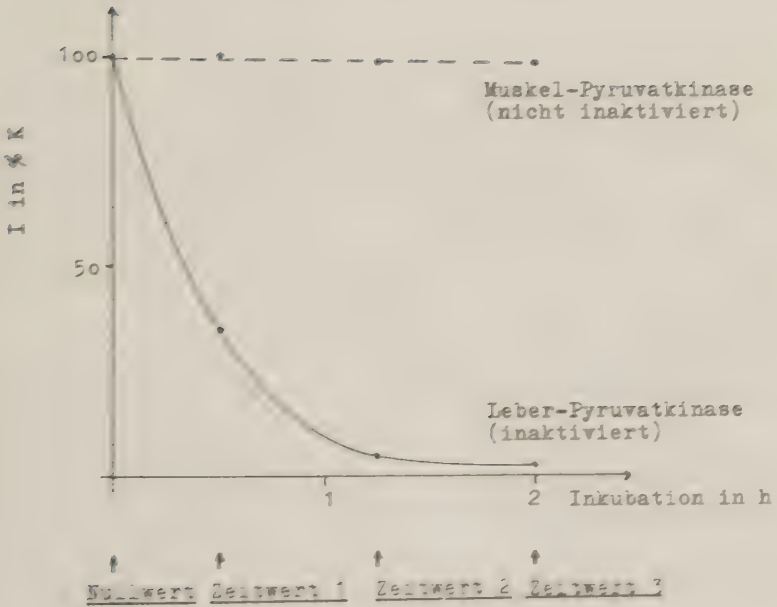


Abb. 2: Verhalten der Aktivität eines inaktivierten und nicht inaktivierten Enzyms während mehrstündiger Inkubation

### III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Inaktivierungsversuche von OTTO und SCHEPERS (1967) waren mit einem kathepsinhaltigen Lysosomenextrakt aus Rattenleber durchgeführt worden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente mit aktiveren und zum Teil weiter gereinigten Kathepsin-Präparaten aus Rindermilz durchgeführt.

#### 1. Durch Kathepsin nicht inaktivierte Enzyme

##### a) Enolase aus Leberhomogenatüberstand

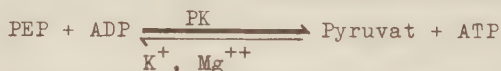
Die Aktivität der Enolase aus Ratten-Leberhomogenatüberstand wurde im (zusammengesetzten) optischen Test mit Hilfs- und Indikatorreaktion bestimmt.

Testprinzip:

Meßreaktion



Hilfsreaktion



Indikatorreaktion



Die Testlösung wurde nach Biochemica BOEHRINGER, Enolase Information (1964) zusammengestellt.

Die Extinktionsmessungen erfolgten im Unicam SP 500 bei 340 nm (Glasküvetten, Testvolumen 3ml).

Die Enolase-Reaktion entsprach einer Reaktion Nullter Ordnung.

Die Inkubationsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

### Inaktivierungsansatz

- 0,1 ml Leberhomogenatüberstand
- 0,1 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol in 0,5 M  $\text{Na}^+$  Phosphatpuffer  $\text{p}_\text{H}$  6,2
- 0,2 ml Aqua dest.
- 0,1 ml "100er NS-Kathepsin"

### Kontrollansatz

Wie der Inaktivierungsansatz, aber anstatt Kathepsin Wasser.

Proben aus diesen Ansätzen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 3fach mit Aqua dest. zwischenverdünnt. Davon wurden 0,1 ml in die entsprechenden Hauptwertküvetten pipettiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Inaktivierungsversuch mit Enolase

|                                                          | K-Wert               | I-Wert | I in % K |
|----------------------------------------------------------|----------------------|--------|----------|
| Nullwert                                                 | 0,0622 <sup>1)</sup> | 0,0662 | 106,2%   |
| Zeitwert 1 (nach 76 Min. Inkubation im 30° C Wasserbad)  | 0,0830               | 0,0851 | 103%     |
| Zeitwert 2 (nach 244 Min. Inkubation im 30° C Wasserbad) | 0,0748               | 0,0768 | 103%     |

1) Die Aktivitäten sind jeweils in  $\mu$  Mol Substratumsatz pro Minute und mg Protein angegeben.

Die zum Teil erheblichen Aktivitätsunterschiede dürften auf unterschiedliche Meßtemperaturen bei den einzelnen optischen Tests zurückgehen.

Eine katheptische Inaktivierung der Leber-Enolase lag nicht vor.

### b) Glutamat-Dehydrogenase aus Rinderleber und Mitochondrienextrakt

Die Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität wurde

1. via  $\alpha$ -Ketoglutarat mit  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NADH}_2$  (nach OLSON und ANFINSEN [1952] ; Testprinzip s. II, 3) als

NADH<sub>2</sub>-Abnahme (Extinktionsabnahme) und

2. via L-Glutamat mit H<sub>2</sub>O und NAD (nach Biochemica BOEHRINGER, Glutamat-Dehydrogenase Information [1962] ) als NADH<sub>2</sub>-Zunahme (Extinktionszunahme) gemäß  
$$\text{L-Glutamat} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD} \rightleftharpoons \alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{NH}_4^+ + \text{NADH}_2$$
  
bestimmt. In beiden Fällen entsprach die durch GLDH katalysierte Reaktion einer Reaktion 1. Ordnung.  
Die Extinktionsänderungen wurden im Unicam ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ , Glasküvetten, Testvolumen 3 ml) gemessen.  
Die Zusammensetzung der Testlösungen entsprach den Angaben der Fa. BOEHRINGER (Biochemica BOEHRINGER, GLDH Information [1955] für 1. und Biochemica BOEHRINGER, GLDH Information [1962] für 2.)

Ad 1.: Als Enzympräparat dienten 0,5 ml Mitochondrienextrakt, die mit 0,15 ml 0,5 M K<sup>+</sup> Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 6,2 und 0,1 ml "100er NS-Kathepsin" (stattdessen im Kontrollwert Aqua dest.) im 30° C Wasserbad inkubiert wurden. Mit 0,2 ml dieser Lösung wurde die Enzymreaktion gestartet. Eine Inaktivierung der Glutamat-Dehydrogenase konnte auch nach 255 Minuten Inkubation nicht festgestellt werden: Nullwert I = 89,5% K

Zeitwert 1 (nach 79 Min.) I = 88% K

Zeitwert 2 (nach 255 Min.) I = 89% K

Die schon beim Nullwert vorhandene 10%ige Abweichung des Inaktivierungswertes vom Kontrollwert könnte lediglich auf eine sofortige Teilinaktivierung geringen Grades durch Kathepsin hindeuten.

Ad 2.: Als Enzympräparat diente GLDH BOEHRINGER, Kristallsuspension in 2,0 M Ammoniumsulfatlösung p<sub>H</sub> ca. 7. 0,05 ml dieses Präparates wurden mit 0,85 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol in 0,5 M Na<sup>+</sup> Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 6,2 und 0,1 ml "100er NS-Kathepsin" bzw. Wasser im 30° C Wasserbad inkubiert. Davon wurden zu verschiedenen Zeiten Proben 1:5 mit 0,1 M Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 7,5 verdünnt und mit 0,1 ml je Küvette eingesetzt. Nach 257

Minuten Inkubation zeigte sich keine Inaktivierung (gemäß II,4) : I = 99% K (Nullwert I = 107% K).

Die spezifische Aktivität betrug 0,5  $\mu$  Mol Substratumsatz/Min. und mg Protein.

c) Creatinphosphatkinase aus Kaninchenmuskel

Aktivitätsbestimmungen wurden nach TANZER und GILVARY (1959) vorgenommen. Das Testprinzip ist bereits unter II,3 aufgeführt. Die Testlösungen waren, wie bei Biochemica BOEHRINGER, CPK Information (1961) angegeben, zusammengesetzt.

Zur Extinktionsmessung diente das Photometer "Eppendorf" mit thermostatisiertem Küvettenhalter ( $\lambda=366$  nm, Glasküvetten, Testvolumen 1,5 ml).

Die Inkubationsansätze wurden folgendermaßen hergestellt:

0,1 ml CPK-Lösung (2,5 mg CPK BOEHRINGER/ml  $\text{Na}^+$  Phosphatpuffer  $\text{p}_\text{H}$  6,2)

0,1 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol

0,4 ml Aqua dest.

0,2 ml "65er NS-Kathepsin" in den Inaktivierungsansatz und 0,2 ml Albumin (15 mg/ml) in den Kontrollansatz.

Davon wurden 0,01 ml je Küvette pipettiert.

Die Aktivitäten der I-Werte lagen bei Beginn der Inkubation zwischen 97 und 98% bezogen auf die K-Werte, nach 48 minütiger Inkubation bei 30° C zwischen 95 und 97,8%, nach 95 minütiger Inkubation bei 92% und nach anschließender über 16 stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur zwischen 70 und 78%.

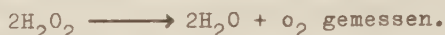
Eine Inaktivierung der CPK durch Kathepsin konnte damit nicht angenommen werden. Selbst nach sehr langer Inkubation war die Aktivität der I-Werte nur um wenig niedriger als die der K-Werte.

Die spezifische Aktivität der CPK betrug 17,6  $\mu$  Mol Substratumsatz/Min. und mg Protein.

d) Katalase aus Rinderleber

Die Aktivität der Katalase wurde - abweichend von den oben aufgeführten Enzymen - nicht im optischen Test ermittelt,

sondern auf Grund der Absorption von Wasserstoffperoxid im UV-Bereich. Die Struktur des Inaktivierungsversuches mußte dadurch allerdings nicht verändert werden. Nach BEER und SIZER (1952) und BERGMAYER (1955) wurde photometrisch die Geschwindigkeit der  $H_2O_2$ -Abnahme gemäß



Die Katalase-Reaktion entsprach einer Reaktion 1. Ordnung. Die Testlösungen wurden nach den Angaben von BERGMAYER (1955) hergestellt.

Die Messung erfolgte im Unicam Spektrophotometer ( $\lambda=240$  nm, Quarzküvetten, 3 ml Testvolumen,  $H_2$ -Lampe).

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze war folgende:

#### 1. Inaktivierungsansatz

1,89 ml 0,05 M  $KH_2PO_4$   $p_H$  6,5

0,01 ml Katalase I >BOEHRINGER<

Die Katalasekristalle lösten sich erst vollständig nach 5 minütigem Aufenthalt im  $32^\circ C$  Wasserbad (das gleiche gilt für 2.).

0,10 ml "100er NS-Katepsin"

#### 2. Kontrollansatz

1,99 ml  $KH_2PO_4$  (s.o.)

0,01 ml Katalase (s.o.)

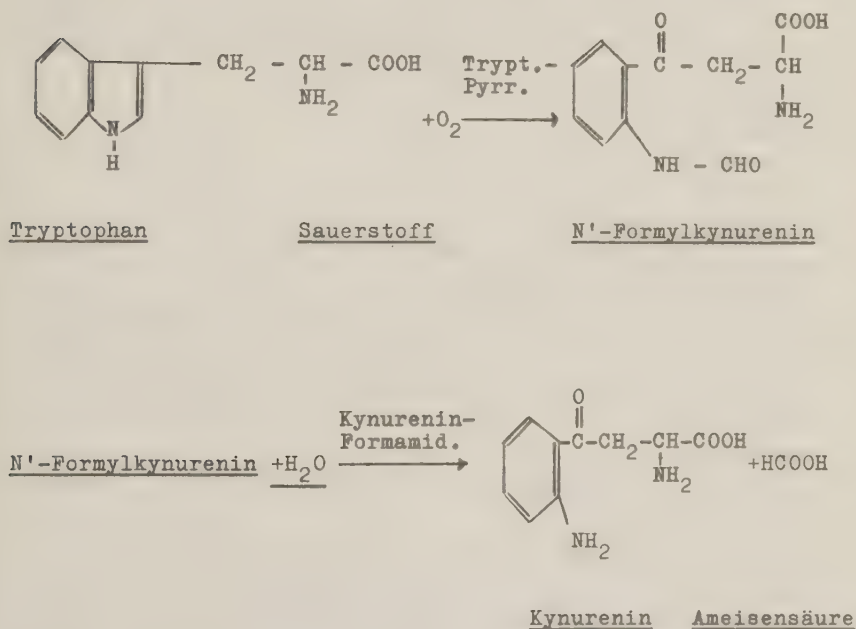
Für die Enzymaktivitätsbestimmung wurden Proben dieser beiden Lösungen 10fach mit 0,66 M  $Na^+$ ,  $K^+$  Phosphatpuffer  $p_H$  7 zwischenverdünnt. Mit 0,02 ml davon wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach nahezu dreistündiger Inkubation im  $32^\circ C$  Wasserbad betrug die Aktivität des I-Wertes 106% von der des K-Wertes (Nullwert: 110%).

Die spezifische Aktivität betrug etwa 39 000  $\mu$  Mol Substratumsatz/Min. und mg Protein (errechnet aus Einheiten je mg nach BERGMAYER durch Multiplizieren mit dem Faktor 13 ; s. Biochemica BOEHRINGER, Katalase Information [1962] ).

#### e) Tryptophan-Pyrrolase aus Leberhomogenatüberstand

Die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase wurde nach KNOX et al. (1966) bestimmt. Es handelt sich dabei nicht um einen

optischen Test im Sinne WARBURG'S und CHRISTIAN'S. Das Prinzip (bereits 1955 von KNOX und AUERBACH entwickelt) ist die spektrophotometrische Bestimmung des Kynurenins ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ ), das aus dem durch Tryptophan-Pyrrolase gebildeten N'-Formylkynurenin durch die in Leberhomogenaten immer im starken Überschuß vorhandene Kynurenin-Formamidase entsteht:



Enzymmaterial war Leberhomogenatüberstand von Ratten, die 5 Stunden vor der Verarbeitung der Lebern Hydrocortison (2,5 mg/100g Körpergewicht) nach vorheriger Ätherkurznarkose intraperitoneal zur Steigerung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität (nach KNOX und AUERBACH 1955) erhielten. Die Lebern wurden mit 0,15 M KCL "in situ" perfundiert. Die Homogenisation erfolgte im 3fachen Volumen 5mM L-Tryptophan-Lösung in 0,15 M KCL zur Steigerung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität

(nach CLOUET und GORDON 1959). Der 100 000 x g Überstand wurde in Anlehnung an KNOX et al. (1966) mit Ascorbinsäure, Hämatin (Hämoglobin nach ANSON) und L-Tryptophan 60 Minuten im 37° C Wasserbad präinkubiert.

Zusammensetzung:

1. Kontrollansatz

- 1,0 ml Leberhomogenatüberstand
- 0,15 ml 0,3 M Ascorbinsäure
- 0,15 ml Hämoglobin nach ANSON<sup>2</sup> ( 5 mg/ml )
- 0,25 ml 5 mM L-Tryptophan in 0,15 M KCl

2. Inaktivierungsansatz

- 1,0 ml Leberhomogenatüberstand
- 0,15 ml Ascorbinsäure (s.o.)
- 0,15 ml Hämoglobin (s.o.)
- 0,05 ml 25 mM L-Tryptophan in 0,15 M KCl
- 0,20 ml "100er NS-Kathepsin"

Die beiden Ansätze wurden nach 60 Minuten Präinkubation 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. 0,25 ml des Dekantates wurden in die entsprechenden Küvetten des Unicam Spektrophotometers mit 3 ml Testlösung nach KNOX und Mitarbeitern (1966) pipettiert.

Die Extinktionszunahme (bei  $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) war für 25 Minuten Testzeit linear.

Nach 60 minütiger Präinkubation (s.o.), die mit einer Inkubation unter Kathepsineinfluß gekoppelt war, konnte ebenso wie nach weiteren 65 Minuten Inkubation im 37° C Wasserbad keine Inaktivierung der Tryptophan-Pyrrolase beobachtet werden (nach 65 Min. : I = 116% K; nach 125 Min. : I = 126%K)

f) Abschließende Betrachtungen

Bei den aufgeführten Inaktivierungsversuchen fiel auf, daß die I-Werte häufig höhere Aktivitäten zeigten als die K-Werte. Das wurde auf einem "stabilisierenden Effekt" des Kathepsin-eiweißes zurückgeführt. In den Experimenten des zweiten Teiles dieser Arbeit wird deshalb, wie das schon bei dem

Inaktivierungsversuch mit CPK geschah, dem Kontrollansatz statt Aqua dest. oder Puffer Albuminlösung - volumenmäßig gleich dem Kathepsinzusatz des Inaktivierungsansatzes - zugesetzt werden.

Die Reihe der auf eine katheptische Inaktivierung untersuchten Enzyme wurde um fünf nicht inaktivierte Enzyme erweitert.

Zusammen mit den Ergebnissen von OTTO und SCHEPERS (1967) ergibt sich damit folgendes Bild:

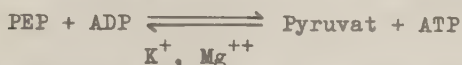
Tab.: 3 Einwirkung von Kathepsinen auf einige Enzyme

| Enzym                                                      | Inakti-<br>vierung |                                                  |
|------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|
| Hexokinase (EC 2.7.1.1)                                    | -                  | Untersuchungen<br>von<br>OTTO<br>und<br>SCHEPERS |
| Glucokinase (EC 2.7.1.2)                                   | +                  |                                                  |
| Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase<br>(EC 1.1.1.49)          | -                  |                                                  |
| Phosphogluconat-Dehydrogenase<br>(EC 1.1.1.43)             | -                  |                                                  |
| Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11)                          | -                  |                                                  |
| Fructosediphosphat-Aldolase<br>(EC 4.1.2.13)               | +                  |                                                  |
| Fructosediphosphat-Aldolase<br>(Muskel) (EC 4.1.2.13)      | +                  |                                                  |
| Glyzerinaldehyd-3-phosphat-<br>Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) | -                  |                                                  |
| 3-Phosphoglycerat-Kinase<br>(EC 2.7.2.3)                   | -                  |                                                  |
| Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)                                | +                  |                                                  |
| Pyruvatkinase (Muskel)<br>(EC 2.7.1.40)                    | - 1)               |                                                  |
| Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)                         | -                  |                                                  |
| Alanin-Aminotransferase (EC 2.6.1.2)                       | -                  |                                                  |
| Aspartat-Aminotransferase<br>(EC 2.6.1.1)                  | -                  |                                                  |
| Tyrosin-Aminotransferase (EC 2.6.1.5)                      | -                  |                                                  |
| Enolase (EC 4.2.1.11)                                      | -                  | eigene<br>Messungen                              |
| Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2)                        | -                  |                                                  |
| Creatinphosphokinase (EC 2.7.3.2)                          | -                  |                                                  |
| Katalase (EC 1.11.1.6)                                     | -                  |                                                  |
| Tryptophan-Pyrrolase (EC 1.13.1.12)                        | -                  |                                                  |

1) siehe aber III, 2. a

## 2. Inaktivierungsversuche mit Pyruvatkinase

Pyruvatkinase<sup>1</sup> katalysiert die Reaktion



Zur Messung der Aktivität dieses Enzyms sind in der letzten Zeit verschiedene Methoden bekannt geworden (u.a. KIMBERG und YIELDING 1962, PON und BONDAR 1967).

Wir benutzten einen zusammengesetzten optischen Test nach dem Prinzip von NEGELEIN (s. II,3) mit der von BEISENHERZ et al. (1953) angegebenen Zusammensetzung. Um eine lineare Extinktionsabnahme<sup>1)</sup> zu erreichen, mußte aber die PEP - Konzentration auf 22 mg/ml (PEP-Kaliumsalz in 0,1 M Tris) erhöht werden. Ein "Leerschleib", der ohne PK-Zugabe vermutlich durch Pyruvatverunreinigungen des Phosphoenolpyruvats entstand, mußte bei allen Aktivitätsberechnungen berücksichtigt werden. Seine Größe war abhängig von der Menge des Indikatorenzyms LDH (das Pyruvat in einer NADH<sub>2</sub> verbrauchenden Reaktion umsetzt).

### a) Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand und Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase

Erste Inaktivierungsversuche wurden in vielfach variiert Form mit "100er NS-Kathepsin" und Kathepsin B' aus Rindermilz vorgenommen.

Dabei zeigte sich wie bei früheren Versuchen mit kathepsinhaltigem Lysosomenextrakt aus Rattenleber ein deutlicher Unterschied zwischen Muskel- und Leber-Pyruvatkinase. Leber-Pyruvatkinase verlor einen großen Teil ihrer Aktivität, während Muskel-Pyruvatkinase gegen den Kathepsinangriff stabil blieb. Die Inaktivierung der Leber-Pyruvatkinase erforderte aber so lange Inkubationszeiten, daß die Stabilität der Kontrollwerte nicht mehr gewährleistet war.

---

1) gemessen im Photometer "Eppendorf" ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ , Glas-  
küvetten, Testvolumen 1,5 ml, thermostatisierter  
Küvettenhalter  $t=25^\circ\text{C}$ )

Die folgenden Versuche wurden deshalb mit einer teilgereinigten Kathepsin-Präparation, dem "65er NS-Kathepsin" (enthaltend die Kathepsine A, B, B' und C) ausgeführt. Mit diesem Material inkubiert zeigte Leber-Pyruvatkinase bereits nach wenigen Stunden eine als vollständig zu bezeichnende Inaktivierung (s. Abb. 3).

Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase verlor innerhalb der gleichen Zeit kaum an Aktivität (s. Abb. 3).

Diese Ergebnisse stellten einen Widerspruch zur Annahme des Arbeitskreises um TANAKA dar, nach dessen Angaben (1965) ein erheblicher Teil der Leber-Pyruvatkinase aus Muskeltyp besteht und somit von Kathepsin nicht inaktiviert werden dürfte.

#### b) Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand und Ratten-Muskelextrakt (Normaltiere)

Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierspezies auszuschließen (die oben verwendete Leber - PK entstammte einem Ratten-Leberhomogenat, das Muskelpräparat war gereinigte Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase), wurden Versuche mit Ratten-Muskelextrakt und Ratten-Leberhomogenat unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt (s. Abb. 4, Kurve a) und b) ).

Die Möglichkeit, daß das Muskelenzym bzw. der Muskeltyp der Leber sich in Gegenwart von Leberproteinen anders verhält und eher einer Inaktivierung anheimfällt als im reinen Muskelextrakt, wurde dadurch überprüft, daß in einem Mischversuch Muskelextrakt und Leberhomogenatüberstand in etwa gleichen Aktivitätsverhältnissen zusammengegeben wurden. Hierbei ergab sich das erwartete Resultat, daß nämlich die Inaktivierung einen mittleren Verlauf nahm (s. Abb. 4, Kurve c). Diese Verlaufsform wäre also auch zu erwarten gewesen, wenn in der Leber ein mit dem Muskelenzym identischer Muskeltyp im Ausmaß von etwa 30 - 50% vorhanden gewesen wäre.

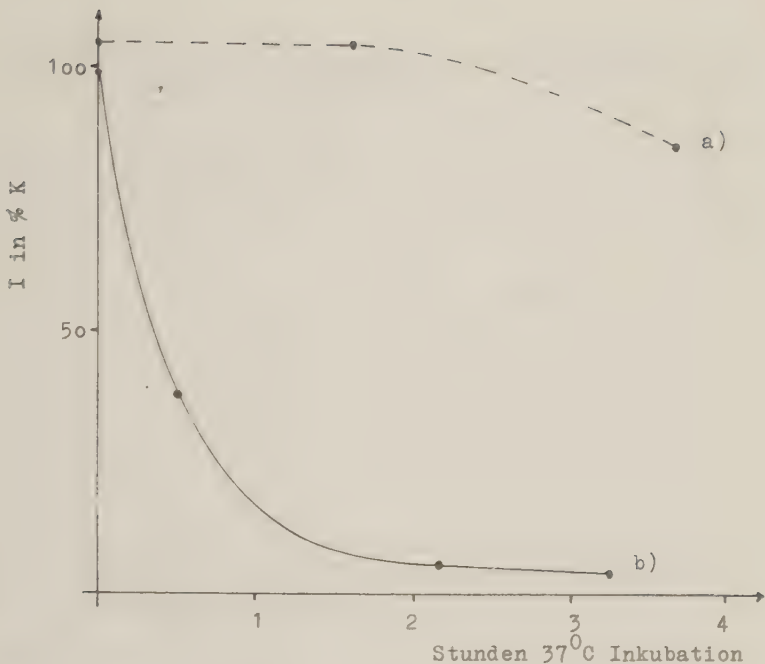


Abb. 3: Inaktivierungsversuch mit PK aus Kaninchenmuskel und Leberhomogenatüberstand

- a) Kaninchenmuskel: 0,05 ml PK BOEHRINGER (10 mg Protein/ml) 1:35 mit Eiswasser (12% Albuminlösung 15 mg/ml enthaltend) verdünnt wurden mit 0,2 ml 0,5 M  $\text{Na}^+$  Phosphatpuffer  $\text{pH}$  6,05, 0,1 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol, 0,45 ml Aqua dest. und 0,2 ml "65er NS-Kathepsin" (Rinderserumalbumin in den Kontrollwert) mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben von 0,01 ml entnommen und auf PK-Aktivität geprüft.
- b) Ratten-Leberhomogenat: 0,05 Leberhomogenatüberstand (20 mg Protein/ml) wurden mit 0,1 ml 0,5 M  $\text{Na}^+$  Phosphatpuffer  $\text{pH}$  6,05, 0,05 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol, 0,1 ml Aqua dest. und 0,2 ml "65er NS-Kathepsin" (stattdessen Aqua dest. in den K-Wert) mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Probenentnahme wie oben, aber 0,03 ml.

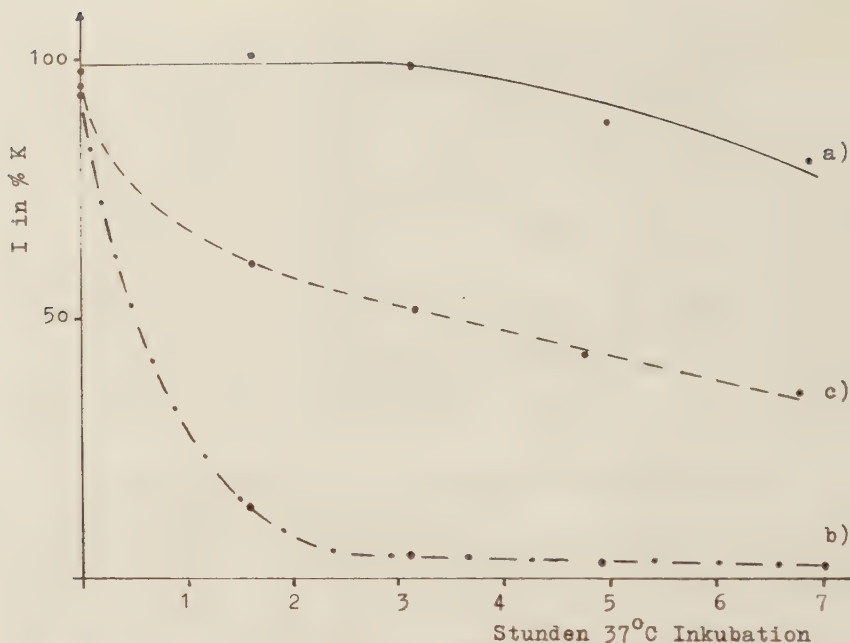


Abb. 4: Verhalten der Pyruvatkinase-Aktivität bei Einwirkung von Rindermilz-Kathepsin (Normaltier)

- a) Muskelpyruvatkinase: 0,05 ml Ratten-Muskelextrakt (5 mg Protein/ml) wurden mit 0,2 ml  $\text{Na}^+$  Phosphatpuffer  $\text{p}_\text{H}$  6,05, 0,1 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol, 0,45 ml Aqua dest. und 0,2 ml "65er NS-Kathepsin" bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben von 0,02 ml entnommen und auf PK-Aktivität geprüft.
- b) Leberpyruvatkinase: 0,05 ml Ratten-Leberhomogenatüberstand (20 mg Prot./ml) wurden in gleicher Weise inkubiert und die Aktivität mit Proben von jeweils 0,06 ml bestimmt.
- c) Mischversuch: Leberhomogenatüberstand und ein auf die gleiche Aktivität (pro Volumeneinheit) verdünnter Muskel-extrakt wurden gemischt und unter obigen Bedingungen inkubiert. Probenentnahme wie unter b).

Die Kontrollversuche enthielten Rinderserumalbumin anstelle des Kathepsins.

c) Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand und Ratten-Muskelextrakt (Hungertiere)

Da nach TANAKA et al. (1965) durch Hunger und andere die Gluconeogenese fördernde Zustände die PK-Aktivität der Leber abnimmt, diese Abnahme aber nur den Lebertyp betreffen soll, tritt unter diesen Umständen also eine prozentuale Zunahme des Muskeltyp-Anteiles auf.

Es sollte sich somit eine eventuelle Anwesenheit des Muskeltyps noch deutlicher abzeichnen. Die oben beschriebenen Inaktivierungsversuche wurden deshalb auch mit Hungertieren durchgeführt. Es ergab sich ein völlig identisches Bild (s. Abb. 5) bei einer um 60% verringerten PK-Aktivität der Leber und nur unwesentlich veränderten Aktivität im Muskel-extrakt (s. Tab. 4).

Tab. 4: PK-Aktivität bei Normal- und Hungertieren

Vergleich der Messungen von TANAKA et al. (1965) mit eigenen Messungen

|             | TANAKA <sup>1)</sup> |                    | eigene Messungen <sup>2)</sup> |                    |                  |
|-------------|----------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|------------------|
|             | Ratten-leber         | Ratten-muskel      | Ratten-leber                   | Ratten-muskel      | Kaninchen-muskel |
| Normaltiere | 0,633                | 25,7               | 0,750                          | 6,80               | 165              |
| Hungertiere | 0,360 <sup>3)</sup>  | 29,6 <sup>3)</sup> | 0,257 <sup>4)</sup>            | 5,82 <sup>4)</sup> | ---              |

1) Angegeben in Enzymeinheiten pro mg Protein des Rohextraktes

2) Angegeben in  $\mu$  Mol Substratumsatz pro mg Protein und Minute

3) Nach 48 Stunden Nahrungsentzug

4) Nach 96 Stunden Nahrungsentzug

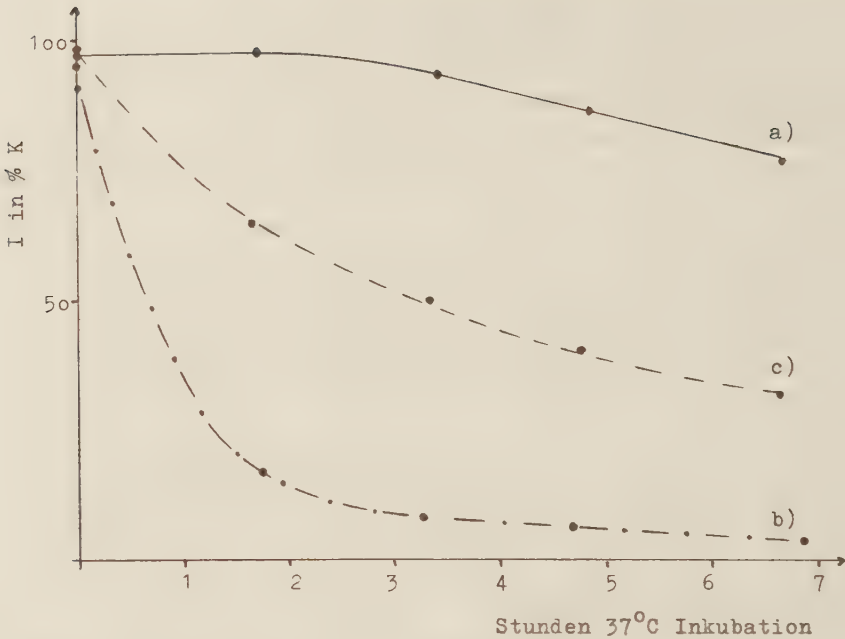


Abb. 5: Verhalten der Pyruvatkinase-Aktivität bei Einwirkung von Rindermilz-Kathepsin (Hungertier; nach 96 h Nahrungsentzug)

Die Herstellung der Inkubationslösung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 4 angegeben. In den Versuchen mit Leberhomogenatüberstand ( a ) und im Mischversuch ( c ) wurden aber 0,07 ml Enzymlösung inkubiert, die zugesetzte Menge Aqua dest. entsprechend auf 0,43 ml verringert und Proben von 0,1 ml auf PK-Aktivität geprüft.

#### d) Verschiedene Homogenisationsmedien

Um eine Heterogenität der PK aus Cytoplasma und aus Mitochondrien der Leber, wie sie etwa für Isocitric-Dehydrogenase bewiesen ist (LOWENSTEIN 1961), und einen vielleicht dadurch bedingten Widerspruch zwischen den Ergebnissen von TANAKA und eigenen Beobachtungen auszuschließen, wurden die Leberhomogenate in Homogenisationsmedien verschiedener Molaritäten (0,05 M KCl bis 0,15 M KCl) angefertigt. In den Mitochondrien lokalisierte PK hätte nach Homogenisation in 0,05 M KCl in das Homogenat übertreten müssen.

Unterschiedliche Inaktivierungen mit diesen Präparaten ergaben sich aber nicht.

Ähnliche Übereinstimmung, allerdings nach elektrophoretischen Messungen, beobachteten FELLEBERG et al. (1963) für Pyruvatkinase aus Gehirnmitochondrien und -cytoplasma.

#### e) Abschließende Betrachtungen

Inaktivierungsversuche mit Trypsin, das dem Kathepsin in mancher Hinsicht ähnlich ist, ergaben Aktivitätsverluste sowohl für Leber-PK als auch für Muskel-PK. Ein eindeutiger Unterschied in den Inaktivierungsgraden konnte dabei nicht gesehen werden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß Trypsin bei geeigneter Konzentration auch bezüglich des Einflusses auf Pyruvatkinase ein dem Kathepsin ähnliches Verhalten zeigt.

Die mitgeteilten Ergebnisse sprechen gegen eine Identität der Muskel-PK mit dem Muskeltyp der Leber, vielmehr deuten sie auf bislang noch nicht erkannte Unterschiede.

Da auch schon von TANAKA und Mitarbeitern (1967) in Nierenextrakten auf elektrophoretischem Wege ein weiterer PK-Typ gefunden wurde, der weder als Leber- noch als Muskeltyp klassifiziert werden konnte, existieren möglicherweise noch weitere Typen, die - ähnlich der Lactatdehydrogenase (u.a. NEILANDS 1952, WIELAND und PFLEIDERER 1957, KAPLAN et al. 1960) - vielleicht Mischtypen aus mehreren Untereinheiten

sein könnten.

### 3. Inaktivierungsversuche mit Aldolase

LEUTHARDT und WOLF stellten 1954 und 1957 fest, daß Aldolase aus Leber und Muskel nicht nur Fructose-1,6-diphosphat (FDP), sondern auch Fructose-1-phosphat (FMP) angreift (vergl. Abb. 6). Ihre Annahme, daß eine distinkte Aldolase die Aldolase-Spaltung von FMP katalysiere, konnte aber nicht gesichert werden (RUTTER et al. 1963).

In jüngeren Arbeiten (PENHOET und Mitarbeiter 1967, RENSING und Mitarbeiter 1967) konnte die Existenz dreier Aldolase-Typen (aus mehreren Organen) und verschiedener Isoenzyme nachgewiesen werden.

Ein wesentliches Charakteristikum der verschiedenen Aldolasen war der FDP/FMP-Quotient.

Die hier beschriebenen Ergebnisse schlossen an Inaktivierungsversuche von OTTO an (s. Teil I).

Zur Messung der Aldolase-Aktivität diente ein zusammengesetzter optischer Test (nach RACKER 1947; vergl. Abb. 6). Die Testlösungen wurden bis auf die Substrate nach Biochemica BOEHRINGER, Aldolase Information (1964) für den "FMP-Weg" und den "FDP-Weg" gleich hergestellt. Mit FMP als Substrat war dabei allerdings das Hilfsenzym TIM überflüssig. Die FMP- und FDP-Endkonzentrationen betrugen nach RUTTER et al. (1961) 5 mM.

Extinktionsmessungen erfolgten im Photometer "Eppendorf" ( $\lambda = 366$  nm, Glasküvetten, 1,5 ml Testvolumen, thermostatisierter Küvettenhalter  $t = 25^{\circ}\text{C}$ ).

#### a) Kaninchenmuskel-Aldolase

Originalpräparate (der Fa. BOEHRINGER & Soehne, Mannheim) und aus diesen hergestellte Verdünnungen unterschiedlichen Alters zeigten - mit Kathepsin B' inkubiert - innerhalb kurzer Zeit (wie schon mit Rattenleber-Lysosomen beobachtet) einen 85 - 90%igen Aktivitätsverlust im optischen Test, sofern FDP als Substrat verwendet wurde (s. Abb. 8).

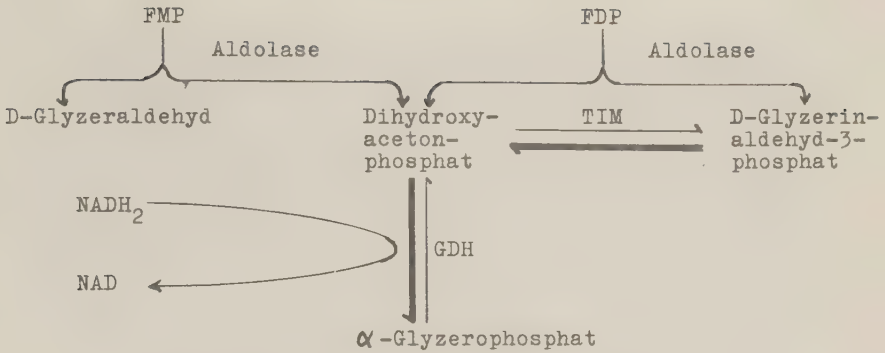


Abb. 6: Reaktionen der Aldolase und Testprinzip

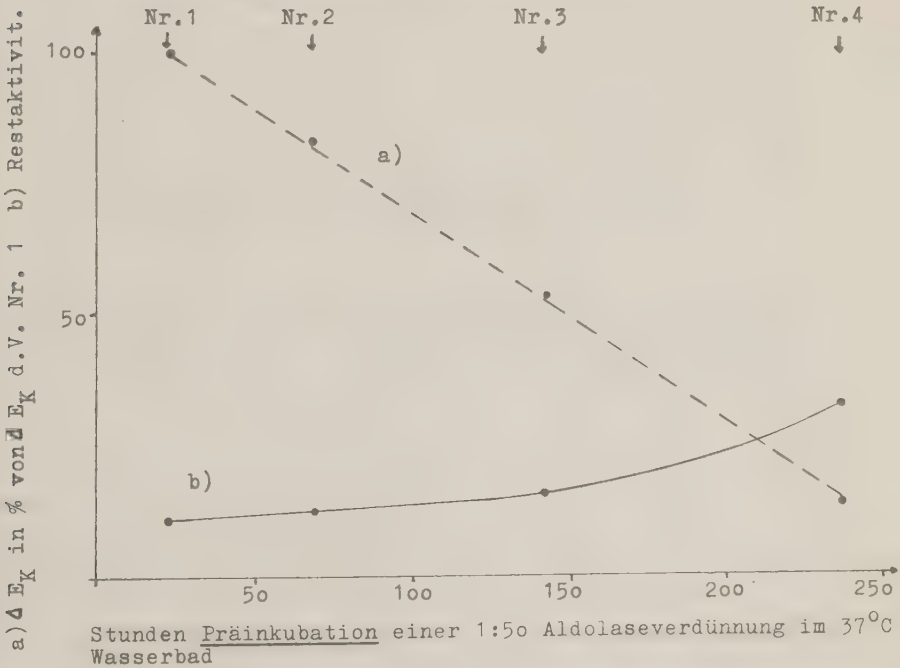


Abb. 7: Aktivität und Restaktivität der Kaninchenmuskelaldolase bei Aufbewahrung im 37°C Wasserbad

Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Restaktivität, die mit 10 - 15% einigermaßen gleich blieb, und der spezifischen Aktivität, die bei den getesteten Präparaten stark differierte (3,56 - 6,55  $\mu$  Mol Substratumsatz je mg Protein und Min.), konnte ebensowenig festgestellt werden, wie eine Abhängigkeit der Höhe der Restaktivität vom Alter eines Originalpräparates oder einer Verdünnung bei Aufbewahrung derselben im Eisschrank (+4°C).

Erst nach längerer Aufbewahrung verschiedener Aldolase-verdünnungen im 37°C Wasserbad konnte ein Abfall der Aktivität und ein relativer Anstieg der Restaktivität in Abhängigkeit von der Zeit dieser Präinkubation beobachtet werden. Das Verhalten von Aktivität (ermittelt durch die jeweiligen Kontrollwerte im Vergleich zum K-Wert des Inaktivierungstestes Nr. 1) und Restaktivität während einer über 200ständigen Präinkubation einer Aldolase-Verdünnung ist in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Aktivität und Restaktivität der Kaninchenmuskel-Aldolase bei Aufbewahrung im 37°C Wasserbad

| Nr. des Inaktivierungstests | Zeitpunkt der Herstellung der Inkubationsansätze 1) | Restaktivität in % der jeweiligen K-Werte | Aktivität der Kontrollwerte in % des K-Wertes von Nr. 1 |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 1                           | 23 h                                                | 10,33                                     | 100                                                     |
| 2                           | 69 h 20'                                            | 12,40                                     | 83                                                      |
| 3                           | 144 h                                               | 15,40                                     | 53                                                      |
| 4                           | 236 h                                               | 32,25                                     | 13,6                                                    |

- 1) In dieser Spalte ist angegeben nach wieviel Stunden Präinkubation bei 37°C einer 1:50 mit Aqua dest. verdünnten Aldolase-Präparation die Inkubationsansätze (Inaktivierung mittels Kathepsin B') hergestellt wurden:

0,2 ml 0,5 M Na<sup>+</sup> Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 6,2, 0,1 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol, 0,1 ml präinkubierter Aldolase (s.o.), 0,1 ml Kathepsin B' bzw. Rinderserumalbumin; Inkubation im 30°C Wasserbad; zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 0,06 ml Inkubationslösung in die Küvetten (Testvolumen 1,5 ml) pipettiert; der Endwert der Inaktivierung war bereits nach etwa 30minütiger Inkubation erreicht, die Restaktivität blieb also von da ab gleich groß; zur Überprüfung wurden aber noch 1 oder 2 weitere optische Tests durchgeführt; der Mittelwert dieser 2 oder 3 Zeitwerte ergab die in der 3. Spalte aufgeführte Restaktivität.

---

Eine graphische Darstellung der Werte der Tab. 5 ist in Abb. 7 gegeben.

Unter den im Rahmen dieser Serie getesteten Aldolase-Präparaten aus Kaninchenmuskel fiel ein etwa 2 Jahre altes Präparat auf, das ohne vorherige Präinkubation nur geringe Aktivität und eine 75%ige Restaktivität zeigte, die sich auch bei weiterer Kathepsin-Zugabe nicht verringerte. Ein von vornherein derartig hoher Wert der Restaktivität konnte trotz eingehender Untersuchungen an anderen noch älteren Präparaten - bei einem etwa 3 Jahre alten Präparat konnte nach über 300 stündiger 37°C-Präinkubation (wie oben durchgeführt) nur ein Anstieg der Restaktivität von 14% auf 32% beobachtet werden - nicht mehr aufgefunden und auch nicht näher erklärt werden.

Die oben beschriebenen Versuche wurden grundsätzlich mit FDP als Substrat durchgeführt.

Beim optischen Test mit Kathepsin inkubierter Muskel-Aldolase-Präparate unter Verwendung von FMP als Substrat ließ sich keine Inaktivierung feststellen. Die Ergebnisse zweier Inaktivierungsversuche mit FMP und FDP sind in Abb. 8 dargestellt.

Ein ähnliches Verhalten der Muskelaldolase unter dem Angriff von Carboxypeptidase A konnte von RUTTER et al. (1961) aufge-

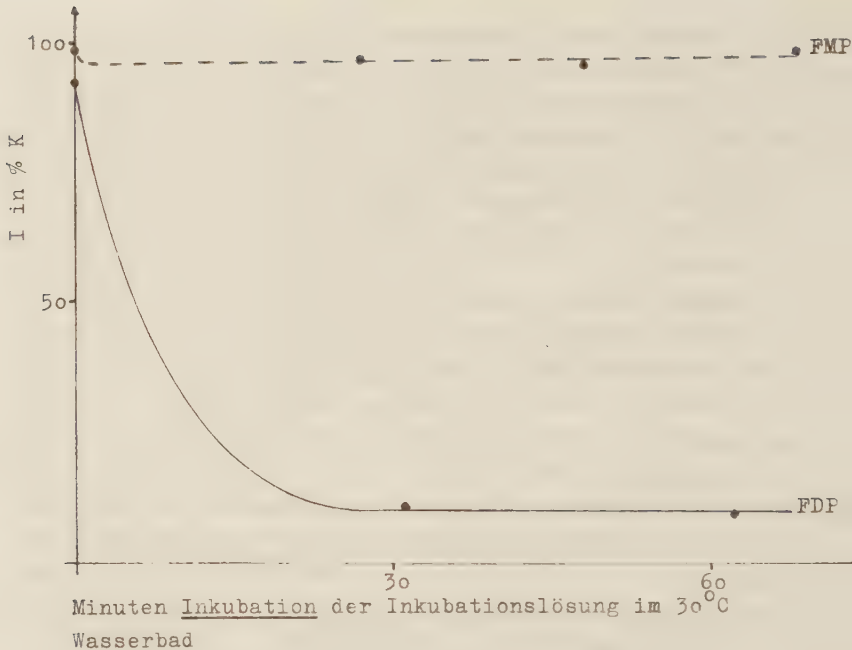


Abb. 8: Kaninchenmuskelaldolase, Inaktivierungsversuche mit FMP und FDP

Inkubationslösungen: 0,1 ml 0,5 M  $K^+$  Phosphatpuffer  $p_H$  6,2  
 0,05 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol  
 bei FMP 0,2 ml Aldolase (10 mg Prot./ml)  
 unverdünnt  
 bei FDP 0,1 ml 1:100 mit Eiswasser verdünnter Aldolase  
 (10 mg Prot./ml)  
 0,1 ml Kathepsin B' in die I-Werte (statt dessen Albumin in die K-Werte)

Die Reaktion wurde mit 0,06 ml Inkubationslösung je Küvette gestartet.

deckt werden. Sie beobachteten eine Aktivitätsminderung der Aldolase durch Carboxypeptidase A bei Verwendung von FDP als Substrat und keinen Einfluß oder eine Aktivitätszunahme mit FMP als Substrat.

b) Aldolase aus Leberhomogenatüberstand

Als Enzymmaterial diente im 2fachen Volumen homogenisierter 100 000 x g-Überstand mit einem mittleren Proteingehalt von 30 mg/ml.

Mit diesem Material wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Inkubationsansätze hergestellt:

- 0,2 ml 0,5 M  $\text{Na}^+$  Phosphatpuffer  $\text{pH}$  6,2
- 0,1 ml 0,2 M  $\beta$ -Mercapto-äthanol
- 0,1 ml Leberhomogenatüberstand
- 0,1 ml Kathepsin B' (Kontrollansatz mit der gleichen Menge Albumin 15 mg/ml)

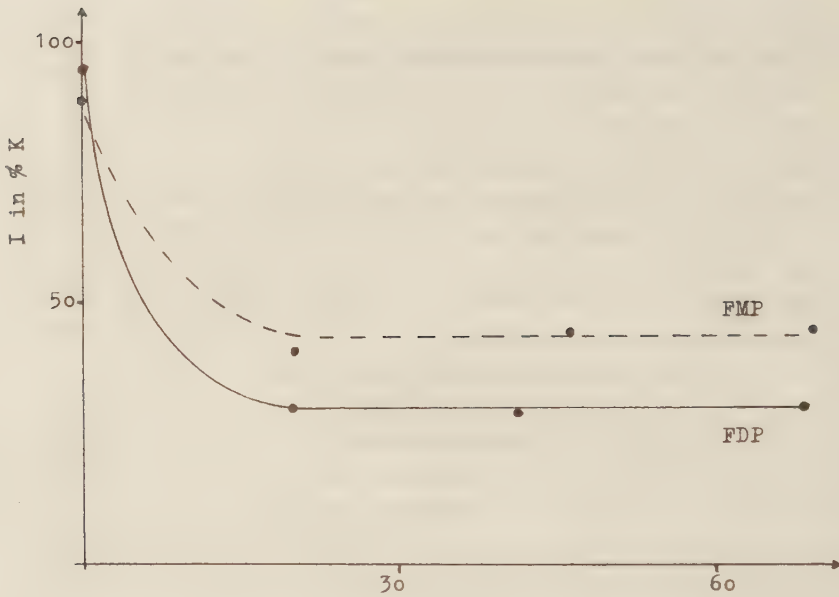
Davon wurden 0,06 ml für einen optischen Test mit FDP und 0,1 ml für einen optischen Test mit FMP je Küvette eingesetzt.

Den Verlauf eines Inaktivierungsversuches mit frischem Leberhomogenatüberstand zeigt Abb. 9. Danach sinkt die Aktivität der Leberaldolase - anders als Muskelaldolase - sowohl bei dem Substrat FDP als auch bei dem Substrat FMP nach Inkubation im 30°C Wasserbad bis auf ein bestimmtes Niveau (Restaktivität) und bleibt bei weiterer Inkubation und auch bei weiterer Kathepsinzugabe unverändert.

Das Niveau der Restaktivität liegt für FMP mit ca. 40% höher als für FDP mit ca. 30%.

Die spezifische Aktivität für FMP betrug 0,017  $\mu$  Mol Substratumsatz je mg Protein und Minute, für FDP 0,046  $\mu$  Mol Substratumsatz je mg Protein und Minute.

Der mehr als 14 Tage im Eisschrank aufbewahrte Leberhomogenatüberstand wies mit beiden Substraten einen relativen Anstieg der Restaktivität bis über 80% unter gleichzeitigem Absinken der Aktivität in Abhängigkeit von der seit der



Minuten Inkubation der Inkubationslösungen im 30°C  
Wasserbad

Abb. 9: Aldolase aus frischem Leberhomogenatüberstand,  
Inaktivierungsversuche mit FMP und FDP

Herstellung verstrichenen Zeit auf.

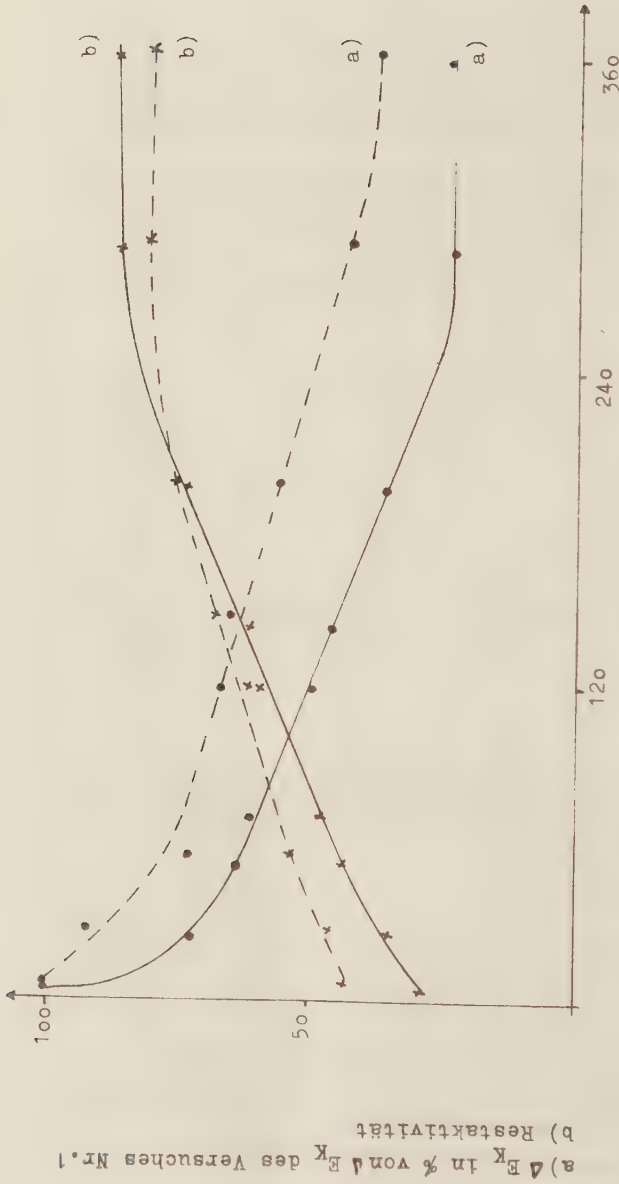
Die Ergebnisse sind in Tab. 6 und Abb. 10 zusammengefaßt.

Tab. 6: Aktivität und Restaktivität der Aldolase aus Leber-  
homogenatüberstand bei Aufbewahrung im Eisschrank

|     | Nr. des<br>Inakti-<br>vierungs-<br>tests | Zeitpunkt der<br>Herstellung der<br>Inkubationsan-<br>sätze | Restaktivität<br>in % der je-<br>weiligen<br>K-Werte | Aktivität der<br>Kontrollwerte<br>in % des K-<br>Wertes v. Nr.1 |
|-----|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| FDP | 1                                        | 3 h 47'                                                     | 28,5                                                 | 100                                                             |
|     | 2                                        | 23 h 46'                                                    | 34,5                                                 | 72,2                                                            |
|     | 3                                        | 51 h 6'                                                     | 43,5                                                 | 64,2                                                            |
|     | 4                                        | 70 h 12'                                                    | 48                                                   | 61,5                                                            |
|     | 5                                        | 118 h 52'                                                   | 59                                                   | 49,2                                                            |
|     | 6                                        | 142 h 14'                                                   | 61,5                                                 | 46,1                                                            |
|     | 7                                        | 195 h 27'                                                   | 74                                                   | 35,6                                                            |
|     | 8                                        | 287 h 30'                                                   | 87                                                   | 23,2                                                            |
|     | 9                                        | 359 h 51'                                                   | 87,5                                                 | 24,1                                                            |
| FMP | 1                                        | 5 h 29'                                                     | 42,6                                                 | 100                                                             |
|     | 2                                        | 27 h 12'                                                    | 46,5                                                 | 92,5                                                            |
|     | 3                                        | 54 h 52'                                                    | 53                                                   | 72,9                                                            |
|     | 4                                        | 119 h 17'                                                   | 61,2                                                 | 66,2                                                            |
|     | 5                                        | 147 h 13'                                                   | 68                                                   | 65                                                              |
|     | 6                                        | 196 h 54'                                                   | 76                                                   | 56                                                              |
|     | 7                                        | 290 h 51'                                                   | 82                                                   | 43                                                              |
|     | 8                                        | 362 h 47'                                                   | 81,4                                                 | 38                                                              |

Eine in Kaninchenmuskel-Präparaten nur angedeutet vorhandene relative Steigerung der Restaktivität ist bei Aldolase aus Leberhomogenatüberstand ausgeprägt vorhanden.

Untersuchungen mit teilgereinigten Aldolase-Präparaten (40 - 60% Ammoniumsulfatfällung im Leberhomogenatüberstand, Dialyse, Gefriertrocknung) ergaben eine Restaktivität von etwa 80% sofort nach Abschluß der Herstellung.



Stunden Aufbewahrung eines Leberhomogenatüberstandes im Eisschrank

Abb. 10: Aktivität (•) und Restaktivität (x) der Leberaldolase bei Aufbewahrung im Eisschrank (---FMP; —FDP)

c) Aldolase aus Gehirnhomogenatüberstand

Als Enzymmaterial diente Gehirnhomogenatüberstand, der wie Leberhomogenatüberstand inkubiert wurde. Je Küvette wurden 0,1 ml Inkubationslösung eingesetzt.

Unter Verwendung von FMP als Substrat wurden etwa 70 mal geringere Aktivitäten gemessen als mit FDP.

Inaktivierungsversuche konnten deshalb nur mit FDP durchgeführt werden.

Die Inaktivierung zeigte mit einer stabilen Restaktivität von etwa 10% nach 20 - 30 Minuten Inkubation einen der Kaninchenmuskel-Aldolase ähnlichen Verlauf.

Mehrtägige Beobachtung der Aktivität und der Restaktivität offenbarte eine außerordentliche Stabilität der Aldolase aus Gehirnhomogenatüberstand. Nach 150 Stunden Aufbewahrung im Eisschrank und anschließender 41 stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur waren die Werte für die Aktivität und Restaktivität unverändert.

Ein anderes Verhalten bei "härteren" Präinkubationsbedingungen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

d) Vergleich der drei Aldolase-Präparate

Alle drei Präparate zeigten einen Umsatz von FDP und FMP. Wie aber bereits aus der Literatur bekannt, waren die FDP/FMP-Quotienten unterschiedlich (vergl. Tab. 7).

Tab. 7: Vergleich der von RUTTER et al. (1961) und CHRISTEN et al. (1966) erhaltenen Aldolase-Aktivitäten mit eigenen Messungen

|     | Muskel       |                     |                     | Leber        |                     |                     | Gehirn              |                     |
|-----|--------------|---------------------|---------------------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| FDP | 100          | 1595                | 6,55                | 8,7          | 62                  | 0,046               | 177                 | 1,61                |
| FMP | 1,9          | 18                  | 0,0213              | 15,4         | 49                  | 0,017               | klein               | 0,0226              |
|     | RUTTER<br>1) | CHRI-<br>STEN<br>2) | eig.<br>Mess.<br>3) | RUTTER<br>1) | CHRI-<br>STEN<br>2) | eig.<br>Mess.<br>3) | CHRI-<br>STEN<br>2) | eig.<br>Mess.<br>4) |

- 1) Angegeben als relative spezifische Aktivität
- 2) Angegeben in JUB milli-Einh./mg Protein
- 3) Angegeben in  $\mu$  Mol Substratumsatz/mg Prot. u. Min.
- 4) Angegeben in  $\mu$  Mol Substratumsatz/g Gehirn u. Min.

Alle drei Präparate wurden durch Kathepsin inaktiviert, sofern FDP als Substrat verwendet wurde.

Muskalaldolase zeigte keine Inaktivierung mit FMP als Substrat.

In der Höhe der Restaktivität glichen sich Muskel- und Gehirnalldolase, ihre Restaktivität lag niedriger als die der Leberaldolase.

Ein relativer Anstieg der Restaktivität mit dem Alter des Präparates konnte andeutungsweise bei Muskalaldolase, ausgeprägt bei Leberaldolase, nicht aber bei Gehirnalldolase gefunden werden (vergl. Tab. 8).

Tab. 8: Vergleich dreier Aldolase-Präparate

|     | Herkunftsorgan                                                | Leber | Muskel   | Gehirn |
|-----|---------------------------------------------------------------|-------|----------|--------|
| FDP | Inaktivierung durch Kathepsin B'                              | +     | +        | +      |
|     | Größe der Restaktivität                                       | 30%   | 10-15%   | 10%    |
|     | Relativer Anstieg der Restaktivität mit der Aufbewahrungszeit | +     | (+)      | -      |
| FMP | Inaktivierung durch Kathepsin B'                              | +     | -        | 1)     |
|     | Größe der Restaktivität                                       | 40%   | 100%     | 1)     |
|     | Relativer Anstieg der Restaktivität mit der Aufbew. Zeit      | +     | entfällt | 1)     |

- 1) Inaktivierungsversuche waren wegen zu geringer Aktivität nicht möglich.
- 

Daraus kann folgende Hypothese abgeleitet werden:

Gehirn-, Leber- und Muskelaldolase bestehen aus einem durch Kathepsin B' zerstörbaren Teil und aus einem gegen den Kathepsinangriff stabilen Teil (Restaktivität).

Bei Muskel- und besonders bei Leberaldolase ist ein relativer Anstieg des von Kathepsin nicht zerstörbaren Anteils unter gleichzeitiger Aktivitätsminderung mit der Aufbewahrungszeit (sog. "Alterung") zu beobachten.

Gehirnaldolase zeigt diese Erscheinungen nicht.

Ein Zusammenhang dieses Verhaltens mit dem unterschiedlichen Umsatz der Substrate FDP und FMP scheint nicht vorhanden zu sein.

Die starke Steigerung der Restaktivität bei Leberaldolase könnte eine spezifische Eigenschaft dieses Enzyms sein oder aber auf die Anwesenheit von Spuren Kathepsin im Leberhomogenat zurückgehen.

Der Versuch Kathepsin im Leberhomogenat mittels N<sup>α</sup>-Benzoylarginin-p-nitroanilid nachzuweisen verlief aber negativ.

#### IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Enzyme Enolase, Glutamat-Dehydrogenase, Creatinphosphokinase, Katalase und Tryptophan-Pyrrolase wurden durch nach dem Verfahren von OTTO gewonnene Rindermilz-Kathepsine nicht inaktiviert.
2. Während Pyruvatkinase aus Ratten-Muskelextrakt und Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase von teilgereinigtem Rindermilz-Kathepsin nicht inaktiviert wurden, erlitt Pyruvatkinase aus Rattenleber einen nahezu vollständigen Aktivitätsverlust.

In einem Gemisch aus Muskel- und Leberenzym wurde nur die Leber-Pyruvatkinase inaktiviert.

Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand von Hunger-ratten zeigte bei einer um 60% verringerten Aktivität die gleiche katheptische Inaktivierung wie Pyruvatkinase aus Leberhomogenatüberstand von Normalratten.

Dies spricht gegen das Vorkommen eines mit dem Muskelenzym identischen "Muskeltyps" in der Leber-Pyruvatkinase.

3. Aldolase aus Ratten-Leber, Kaninchenmuskel und Rattenhirn besteht aus einem durch Kathepsin B' zerstörbaren und aus einem gegen Kathepsin B' stabilen Teil. Bei Muskel- und besonders bei Leberpräparaten konnte ein relativer Anstieg des stabilen Teiles mit der Aufbewahrungszeit ("Alterung") unter gleichzeitiger Aktivitätsminderung beobachtet werden. Aldolase aus Kaninchenmuskel wird bei Verwendung von FMP als Substrat nicht durch Kathepsin B' inaktiviert.

V. LITERATUR

Beer jr., R.F., J.W. Sizer,

A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown  
of Hydrogen Peroxide by Catalase.

J. biol. Chem. 195 (1952) 133

Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok,

K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt, G. Pfeleiderer,

Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-  
Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-  
Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur  
in einem Arbeitsgang.

Z. Naturforsch. 8 b (1953) 555

Bergmeyer, H.U.,

Zur Messung von Kathalaseaktivitäten.

Biochem. Z. 327 (1955) 255

Christen, Ph., U. Rensing, A. Schmid, F. Leuthardt,

Multiple Formen der Aldolase in Organextrakten der Ratte.

Helv. chim. Acta 49 (1966) 1872

Clouet, D.H., M.W. Gordon,

The Effekt of Tryptophan on the Tryptophan Peroxydase  
Activity of Cell-Free Systems from Rat Liver.

Arch. Biochem. Biophys. 84 (1959) 22

Druckschriften der Firma Boehringer & Soehne, Mannheim:

Biochemica Boehringer, Aldolase Information,

Mannheim 1964

"

"

Creatinphosphokinase Information

Mannheim 1961

"

"

Enolase Information

Mannheim 1964

"

"

Glutamat-Dehydrogenase Information

Mannheim 1955

Biochemica Boehringer, Glutamat-Dehydrogenase Information  
Mannheim 1962  
" " Katalase Information  
Mannheim 1962

Fellenberg von, R., R. Richterich, H. Aebi,  
Elektrophoretisch verschieden wandernde Pyruvat-Kinasen  
aus einigen Organen der Ratte.  
Enzymol. biol. clin. 3 (1963) 240

Fruton, J.S.,  
Cathepsins, in P.D. Boyer, H. Lardy u. M. Myrbäck, The  
Enzymes Bd. 4 S. 233  
Academic Press, New York 1960

Greenbaum, L.M., J.S. Fruton,  
Purification and Properties of Beef Spleen Cathepsin B.  
J. biol. Chem. 226 (1957) 173

Kaplan, N.O., M.M. Ciotti, M. Hamolsky, R.E. Bieber,  
Molecular Heterogeneity and Evolution of Enzymes.  
Science 131 (1960) 392

Keney, F.T.,  
Induktion of Tyrosine- $\alpha$ -Ketoglutarate Transaminase in  
Rat Liver.  
J. biol. Chem. 237 (1962) 3495

Kimberg, D.V., K.L. Yielding,  
Pyruvate Kinase.  
J. biol. Chem. 237 (1962) 3233

Knox, W.E., V.H. Auerbach,  
The Hormonal Control of Tryptophan Peroxydase in the Rat.  
J. biol. Chem. 214 (1955) 307

Knox, W.E., M.M. Piras, K. Tokuyama,  
Tryptophan Pyrrolase of Liver.  
J. biol. Chem. 241 (1966) 297

Krimsky, J., E. Racker,  
Protection of Glycolysis in Mouse Brain Homogenates by  
Amides and Esters of Amino Acids.  
J. biol. Chem. 179 (1949) 903

Leuthardt, F., H.P. Wolf,  
Über die Spezifität der Aldolasen.  
Helv. chim. Acta 37 (1954) 1734

Lowenstein, J.M.,  
The Pathway of Hydrogen in Biosyntheses.  
J. biol. Chem. 236 (1961) 1217

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall,  
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.  
J. biol. Chem. 193 (1951) 265

Negelein, E.,  
Durch Kriegseinwirkung verlorengegangene Arbeit vgl.  
Bücher und Pfeleiderer in Colowick-Kaplan, Methods in  
Enzymology, I, 435, 436, 440,  
Academic Press New York 1955

Neillands, J.B.,  
Studies on Lactic Dehydrogenase of Heart.  
J. biol. Chem. 199 (1952) 373

Olson, J.A., G.B. Anfinsen,  
The Crystallization and Characterization of L-Glutamic  
Acid Dehydrogenase.  
J. biol. Chem. 197 (1952) 67

Otto, K.,  
Vergleich der normalen und Glucocorticoidinduzierten  
Alanin-Transaminase der Rattenleber.

Hoppe-Seyler 336 (1964) 69

Otto, K.,  
Anreicherung und Eigenschaften der Glukokinase der  
Rattenleber.

Hoppe-Seyler 346 (1966) 42

Otto, K., P. Schepers,  
Über die katheptische Inaktivierung einiger Enzyme der  
Rattenleber, insbesondere der Glucokinase.

Hoppe-Seyler 348 (1967) 482

Otto, K.,  
Über ein neues Kathepsin.

Hoppe-Seyler 348 (1967) 1449

Penhoet, E., M. Kochmann, R. Valentine, W.J. Rutter,  
The Subunit Structure of Mammalian Fructose Diphosphate  
Aldolase.

Biochemistry 6 (1967) 2940

Pon, N.G., J.L.R. Bondar,  
A Direkt Spectrophotometric Assay for Pyruvate Kinase.  
Analyt. Biochem. 272 (1967) 19

Racker, E.,  
Spektrophotometric Measurement of Hexokinase and  
Phosphohexokinase Activity.

J. biol. Chem. 167 (1947) 843

Racker, E., J. Krinsky,  
Inhibition of Coupled Phosphorylation in Brain Homogenates  
by Ferrous Sulfate.

J. biol. Chem. 173 (1948) 519

Rensing, U., A. Schmid, Ph. Christen, F. Leuthardt,  
Purification and some Properties of Aldolase-Isoenzymes  
from Bovine Brain and Muscle.

Hoppe-Seyler 348 (1967) 1001

Richterich, R.,

Klinische Chemie,

Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a.M. 1965

Rutter, J.W., O.C. Richards, B.M. Woodfin,

Comparative Studies of Liver and Muscle Aldolase.

J. biol. Chem. 236 (1961) 3193

Rutter, J.W., R.E. Blostein, B.M. Woodfin, C.S. Weber,

Enzyme Variants and Metabolic Diversification in G. Weber,

Advances in Enzyme Regulation Vol. I. S. 39, Pergamon Press,

Oxford, London, New York, Paris 1963

Tanaka, T., Y. Harano, H. Morimura, R. Mori,

Evidence for the Presence of Two Types of Pyruvate  
Kinase in Rat Liver.

Biochem. biophysic. Res. Commun. 21 (1965) 55

Tanaka, T., Y. Harano, F. Sue, H. Morimura,

Crystallization, Characterization and Metabolic Regulation

of Two Types of Pyruvate Kinase Isolated from Rat Tissues.

J. Biochem. (Tokyo) 62 (1967) 71

Tanzer, M.L., C. Gilvary,

Creatine and Creatine Kinase Measurement.

J. biol. Chem. 234 (1959) 3201

Warburg, O., W. Christian,

Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von  
Gärungsfermenten. (Pyridin-Nucleotide.)

Biochem. Z. 287 (1936) 291

Wieland, Th., G. Pfeleiderer,  
Nachweis der Heterogenität von Milchsäure-dehydrogenasen  
verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese.  
Biochem. Z. 329 (1957) 112

Wolf, H.P., F. Leuthardt,  
Über Aldolasen.  
Helv. chim. Acta 40 (1957) 237

### Lebenslauf

Am 11. 6. 1943 wurde ich als zweites Kind der Eheleute Friedrich Wilhelm Hörnchen und Aline, geb. Bungenberg in Hellen - thal (Eifel) geboren. Von Ostern 1950 an besuchte ich 4 Jahre die Volksschule in Hellenenthal, von 1954 bis 1963 den humanistischen Zweig des Städtischen Gymnasiums in Schleiden. Nach der Abitur - prüfung am 28. 2. 1963 immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1963 erstmals an der Universität Bonn zunächst für die Fächer Mathematik und Physik. Vom Wintersemester 1963/64 an studierte ich bis zum Sommersemester 1966 in Bonn Medizin. Nach einem einsemes - trigen Studium an der Universität Innsbruck arbeitete ich von Juni 1967 bis April 1968 bei Herrn Doz. Dr. K. Otto an meiner Dissertation. Während dieser Zeit nahm ich als Hilfsassistent am Praktikum für physiologische Chemie teil.

Am 16. 7. 1969 bestand ich an der Universität Bonn das medizi - nische Staatsexamen.

Herrn Prof. Dr. K. Otto danke ich  
für die Überlassung des Themas und  
für seine großzügige Unterstützung  
bei der Durchführung der Arbeit.



difo-druck schmacht · bamberg